

日 本 国 特 許 庁

PATENT OFFICE
JAPANESE GOVERNMENT

17.08.00

EU

別紙添付の書類に記載されている事項は下記の出願書類に記載されている事項と同一であることを証明する。

This is to certify that the annexed is a true copy of the following application as filed with this Office.

出 願 年 月 日
Date of Application:

1999年 8月17日

RECD 05 OCT 2000

出 願 番 号
Application Number:

平成11年特許願第230642号

IN PCT

PCT

出 願 人
Applicant(s):

科学技術振興事業団

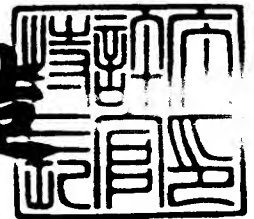
PRIORITY DOCUMENT

SUBMITTED OR TRANSMITTED IN
COMPLIANCE WITH RULE 17.1(a) OR (b)

2000年 9月22日

RECEIVED
Patent Office

及 川 耕 造



【書類名】 特許願

【整理番号】 NP99310-YS

【提出日】 平成11年 8月17日

【あて先】 特許庁長官 殿

【国際特許分類】 C07H 21/00

C07K 14/47

【発明の名称】 ラット b c l - x L 遺伝子の改変型 c D N A

【請求項の数】 3

【発明者】

【住所又は居所】 東京都町田市本町田 1 7 5 4 - 3 5

【氏名】 太田 成男

【発明者】

【住所又は居所】 神奈川県川崎市中原区上平間 5 5 8 - 1

A J U 平間 3 0 6

【氏名】 麻生 定光

【特許出願人】

【識別番号】 396020800

【氏名又は名称】 科学技術振興事業団

【代理人】

【識別番号】 100093230

【弁理士】

【氏名又は名称】 西澤 利夫

【電話番号】 03-5454-7191

【手数料の表示】

【予納台帳番号】 009911

【納付金額】 21,000円

【提出物件の目録】

【物件名】 明細書 1

【物件名】 図面 1

【物件名】 要約書 1
【プルーフの要否】 要

【書類名】 明細書

【発明の名称】 ラット bcl-xL 遺伝子の改変型 cDNA

【特許請求の範囲】

【請求項 1】 配列番号 1 に塩基配列を示したラット bcl-xL 遺伝子 cDNA 配列において、第 22 番目 Tyr を Phe に変換する塩基置換、第 26 番目 Gln を Asn に変換する塩基置換および 165 番目 Arg を Lys に変換する塩基置換のうち、少なくとも一つの塩基置換を有することを特徴とするラット bcl-xL 遺伝子の改変型 cDNA。

【請求項 2】 請求項 1 の改変型 cDNA を保有する組換えベクター。

【請求項 3】 請求項 2 の組換えベクターが導入された形質転換細胞。

【発明の詳細な説明】

【0001】

【発明の属する技術分野】

この出願の発明は、ラット bcl-xL 遺伝子の改変型 cDNA に関するものである。さらに詳しくは、この出願の発明は、ラットのアポトーシス抑制遺伝子 bcl-xL よりもさらに高いアポトーシス抑制活性を有する改変型タンパク質 Bcl-xL を発現する新規な cDNA と、この cDNA の遺伝子工学的利用のための材料に関するものである。

【0002】

【従来の技術】

アポトーシス (apoptosis) は、プログラムされた細胞死の一種であり、周囲の細胞との接触の欠乏、細胞質の濃縮化、エンドヌクレアーゼの活性に関連したクロマチンの凝縮および核凝縮、核の断片化、膜被包性球状小体化、隣接するマクロファージもしくは上皮細胞などによる球状小体の貪食、またはエンドヌクレアーゼ活性により DNA のヌクレオソーム単位が 180~200 塩基長の DNA に断片化するといった現象が観察され、このような現象が認められるアポプティック体細胞の最終断片が隣接する細胞により貪食される機構として論じられている (例えば、Immunology Today 7:115-119, 1986; Science 245:301-305, 1989)。

【0003】

このアポトーシスを制御する遺伝子としてしては、例えば、ヒト濾胞性B細胞腫から発見されたガン遺伝子のひとつであるbcl-2遺伝子 (Science 226(4678):1097-1099, 1984; Pro. Natl. Acad. Sci. USA 81(22):7166-7170, 1984) が知られており、その遺伝子構造や転写産物の解析あるいはcDNAクローンが報告されている (Pro. Natl. Acad. Sci. USA 83(14):5214-5218, 1986; Cell 47(1):19-28, 1986)。このbcl-2遺伝子は、免疫系や神経性の細胞で高頻度に発現しており、この遺伝子の発現産物はこれら細胞のアポトーシスを抑制することによって、ヒトの免疫機能や神経系機能の恒常性を維持していると考えられている。また、このbcl-2遺伝子は、胎児では特に広範囲には発現していることから、個体発生の際の形態形成にも重要な役割を果たしていると考えられてもいる。

【0004】

その後、このヒトbcl-2遺伝子のホモログがウシ、ラット、ニワトリ等で見いだされ、bcl-2ファミリーと総称されている。

この出願の発明者らも、bcl-2ファミリーに属するヒトbcl-xL遺伝子 (Cell 74(4):597-608, 1993) のホモログとしてラットbcl-xL遺伝子をクローニングし (J. Biol. Chem. 271(22):13258-13265, 1996)、またこのラットbcl-xL遺伝子が発現するタンパク質Bcl-xLの立体構造をX線解析により決定している (J. Biol. Chem. 272(44):27886-27892, 1997)。

【0005】

【発明が解決しようとする課題】

この出願の発明者らは、ラットBcl-xLのアポトーシス抑制効果をさらに増強することを目的として、その立体構造を変化させうるアミノ酸置換について検討した結果、特定のアミノ酸を他のアミノ酸に置換するようにbcl-xL遺伝子cDNAを改変させ、この改変型cDNAを細胞内で発現させると、この細胞アポトーシスが顕著に抑制されることを見いだした。

【0006】

この出願の発明者らは、ラットBcl-xLのアポトーシス抑制効果をさらに増強することを目的として、その立体構造を変化させうるアミノ酸置換について検討した結果、特定のアミノ酸を他のアミノ酸に置換するようにbcl-xL遺伝子cDNAを改変させ、この改変型cDNAを細胞内で発現させると、この細胞アポトーシスが顕著に抑制されることを見いだした。

とのできる改変型cDNAを提供することを課題としている。

【0007】

またこの出願は、この改変型 cDNA を保有する組換えベクターと、この組換えベクターによる形質転換細胞を提供することを課題としてもいる。

【0008】

【課題を解決するための手段】

この出願は、前記の課題を解決するため、次の(1)から(3)の発明を提供する。

- (1) 配列番号 1 に塩基配列を示したラット bcl-xL 遺伝子 cDNA 配列において、第22番目 Tyr を Phe に変換する塩基置換、第26番目 Gln を Asn に変換する塩基置換および165番目 Arg を Lys に変換する塩基置換のうち、少なくとも一つの塩基置換を有することを特徴とするラット bcl-xL 遺伝子の改変型 cDNA。
- (2) 前記(1)の改変型 cDNA を保有する組換えベクター。
- (3) 前記(2)の組換えベクターが導入された形質転換細胞。

【0009】

【発明の実施の形態】

この出願の前記発明(1)の改変型 cDNA は、配列番号 1 に塩基配列を示したラット bcl-xL 遺伝子 cDNA 配列において、第22番目の Tyr コドン (tac) を Phe コドン (ttt/ttc) に変換する塩基置換、第26番目 Gln (cag) を Asn コドン (aat/aac) に変換する塩基置換、165番目 Arg コドン (cgg) を Lys コドン (aaa/aag) に変換する塩基置換のうち、少なくとも一つの塩基置換を有する cDNA である。そして、この発明(1)の改変型 cDNA においては、以上の3カ所全ての塩基置換を有することを好ましい態様としている。3カ所の塩基置換を有する改変型 cDNA の場合、配列番号 2 にアミノ酸配列を示した改変型タンパク質 Bcl-xL FNK を発現する。この改変型タンパク質 Bcl-xL FNK は、図 1 に構造模式図を示した野生型ラット Bcl-xL における第22番目 Tyr と第156番目 Asp、第26番目 Gln と第164番目 Ser、第165番目 Arg と第116番目 Pro のそれぞれの水素結合が、前記の塩基置換によって生じるアミノ酸置換 (Tyr22 Phe : Gln26 Asn : Arg165 Lys) の結果、消失している。

【0010】

この改変型 cDNA は、ラット bcl-xL 遺伝子 cDNA を鋳型として、ミュー

テーション・キット等を使用する公知の方法や、あるいは後記の実施例に示した PCR 法などにより作成することができる。ラット bcl-xL 遺伝子 cDNA はプラスミッド pEF1-BOSbcl-x (J. Biol. Chem. 271(22): 13258-13265, 1996) を使用することができる。あるいはまた、配列番号 1 の任意部分の塩基配列に基づいてオリゴヌクレオチドを合成し、これをプローブとして用いてラット cDNA ライブラリーをスクリーニングする方法や、目的とする cDNA 断片の両末端にハイブリダイズするオリゴヌクレオチドを合成し、これをプライマーとして用いてラット細胞から単離した mRNA から RT-PCR 法により調製することもできる。

【0011】

この出願の前記発明(2)の組換えベクターは、導入する細胞の種類(例えば、大腸菌、枯草菌等の原核細胞や、酵母、昆虫細胞、哺乳動物細胞、植物細胞等の真核細胞など)に応じて適宜な発現ベクターを選択し、これに発明(1)の改変型 cDNA を組み込むことによって作成することができる。例えば、大腸菌などの微生物を対象とする場合には、微生物中で複製可能なオリジン、プロモーター、リボソーム結合部位、ターミネーター等を有する発現ベクターの DNA クローニング部位に前記(1)の改変型 cDNA を組み込むことによって作成することができる。また、哺乳動物細胞等の真核細胞を対象とする場合には、プロモーター、スプライシング領域、ポリ(A)付加部位等を有する真核細胞用発現ベクターを用いて発明(2)の組換えベクターを作成することができる。

【0012】

この出願の前記発明(3)の形質転換細胞は、発明(2)の組換えベクターが導入され、改変型タンパク質 Bcl-xL を発現する細胞である。細胞の種類は特に制限はなく、例えば、大腸菌、枯草菌等の原核細胞や、酵母、昆虫細胞、哺乳動物細胞、植物細胞等の真核細胞など前記(2)の組換えベクターによって形質転換可能な全ての細胞が含まれる。組換えベクターを細胞に導入するには公知の方法を用い

る方法、
 いることができる。

【0013】

なお、この発明(3)の形質転換細胞のうち、特に哺乳動物細胞は、後記の実施例にデータを示すように、無血清培地でも増殖可能である。すなわち、一般に培養細胞を一定の期間生存させるには、増殖因子を含む血清（ウシ胎児血清など）を培地に添加する必要がある。増殖因子によって細胞のアポトーシスが抑制され、生存期間を延長することができるからである。しかしながら、例えば生理活性物質やモノクローナル抗体などの細胞生成物を動物細胞から回収して精製する場合には、培地中に血清のような不純物が含まれていないことが望ましい。目的の物質を精製するための費用や工程が増加することや、血清中にウイルス等の危険因子が混入している危険性も存在するからである。そこで、培養液に血清を用いない無血清無蛋白培地が用いられてもいるが、実際には無血清無蛋白培地では細胞の増殖の程度は低く、死細胞も多い。そして、死細胞が多いと細胞の内容物が流出して培地を汚染するという問題も存在する。

【0014】

一方、増殖因子を使用することなく細胞を増殖させる方法として、癌遺伝子の導入によって細胞を形質転換する方法も知られている。しかしながら、癌遺伝子産物が多量に発現すると、むしろアポトーシスが促進されることが明らかにされている。

【0015】

発明(3)の形質転換哺乳動物細胞は、改変型タンパク質 Bcl-xL の発現によって、血清等の増殖因子が存在せずともアポトーシスを生じることなく、長期間にわたって培養することが可能である。また、このような優れた増殖能により、セルライン化が可能でもある。

【0016】

【実施例】

以下、実施例を示してこの出願の発明についてさらに詳細かつ具体的に説明するが、この出願の発明は以下の例によって限定されるものではない。

実施例 1：改変型 cDNA の作成

ラット Bcl-xL の cDNA クローン pEF1-BOSbcl-x (J. Biol. Chem.

271:13258-13265, 1996)をテンプレート(鋳型)にして2段階PCR法により2つのDNA断片(bcl-xLR165K、bcl-xLY22F/Q26N)を合成し、最終的にこれらのDNA断片の所定領域を結合することにより、3カ所のアミノ酸置換(Tyr22Phe:Gln26Asn:Arg165Lys)を導入した改変型cDNA**bcl-xLFN**Kを作成した。

【0017】

先ず、Arg165Lysの置換導入したbcl-xR165Kを作製するために、2つのDNA断片(A、B)をPCR合成した。DNA断片(A)は、5'側プライマーとして配列番号3に示したプライマー1を、3'側プライマーとして配列番号4に示したプライマー2を用いた。プライマー1は、bcl-xcDNAの翻訳領域の上流で、ベクターの塩基配列を一部含む。また制限酵素BamHI切断部位を含んでいる。プライマー2は、bcl-xcDNAのアンチセンス配列で、Arg165のコドンをLysをコードするように置換している。

【0018】

DNA断片(B)は、5'側プライマーとして配列番号5に示したプライマー3を、3'側プライマーとして配列番号6に示したプライマー4を用いた。プライマー3はbcl-xcDNAのセンス配列で、Arg165のコドンをLysをコードするように塩基置換しており、5'側半分の塩基配列はプライマー2の5'側半分の塩基配列と相補的である。プライマー4はbcl-xcDNAのアンチセンス配列で、その翻訳領域アミノ酸残基178から184に対応する。また、制限酵素BamHIの切断部位を含んでいる。

【0019】

PCR反応の詳細は以下のとおりである。

- ・反応溶液(溶液量100 μ l): 10 mM Tris-HCl, pH8.3, 50 mM KCl, 1.5 mM MgCl₂, 0.001% gelatin, dATP, dCTP, dTTP, dGTP各0.2 mM
- ・AmpliTaQGold: 2.5 U

- ・テンプレートDNA: 50 ng

・反応条件 1 : 94℃/10分 ; (94℃/30秒 ; 53℃/30秒 ; 72℃/1分) × 15

反応後、増幅された 2 つの DNA 断片 (A、B) はポリアクリルアミドゲル電気泳動で精製した。次いで、上記 PCR 反応溶液 (25 μ l) に DNA 断片 A、B (それぞれ 6ng) を混合し、AmpliTaQGold を使って各々の相補鎖を合成した。合成条件は以下の反応条件 2 のとおりとした。

・反応条件 2 : 94℃/10分 ; (94℃/30秒 ; 41℃-47℃/30秒 ; 72℃/1分) × 4

反応後、プライマー 1 とプライマー 4 (最終濃度各 1 μ M) と AmpliTaQGold (2.5 U) を含む PCR 反応溶液 75 μ l を加え、前記の反応条件 1 により PCR を実行した。650 bp の PCR 産物をポリアクリルアミドゲル電気泳動で精製し、制限酵素 Bam HI で処理した。一方、pEF-1BOSbcl-x (2ヶ所の Bam HI 部位をもつ) を Bam HI で処理して 2 本の DNA 断片 (5650 bp と 650 bp) を調製し、長い DNA 断片 (5650 bp) に前記 PCR 産物を順方向に結合させ、Arg165Lys の変異を有するクローン pEF1-BOSbcl-xR165K を得た。

【0020】

bcl-xLY22F/Q26N は、先ず Gln26Asn のアミノ酸置換を導入し、次いで Tyr22Phe のアミノ酸置換を付加した。PCR は、pEF1-BOSbcl-x (50 ng) をテンプレートとして、前記プライマー 1 およびプライマー 5 (配列番号 7) の組み合わせと、前記プライマー 4 およびプライマー 6 (配列番号 8) の組み合わせでふたつの PCR を別々に行った。反応溶液 (100 μ l) の組成は前記と同様であり、反応条件は前記の条件 1 とした。なお、プライマー 5 は bcl-xcDNA のアンチセンス配列であり、Gln26 のコドン を Asn をコードするように塩基置換してある。また、プライマー 6 は bcl-xcDNA のセンス配列で、Gln26 のコドン を Asn をコードするように塩基置換しており、5' 側半分の塩基配列はプライマー 5 の 5' 側半分の塩基配列と相補的である。

【0021】

PCR で増幅されたふたつの PCR 産物をポリアクリルアミドゲル電気泳動で精製し、2 つの DNA 断片 (それぞれ 6ng) を混合し、AmpliTaQGold を使って相補鎖を合成した。合成の条件は前記反応条件 2 と同一とした。

【0022】

反応後、プライマー 1 とプライマー 4 (最終濃度各 $1 \mu\text{M}$) と AmpliTaqGOLD (2.5 U) を含む PCR 反応溶液 ($75 \mu\text{l}$) を加え、反応条件 1 により PCR を行った。650 bp の PCR 産物をポリアクリルアミドゲル電気泳動で精製し、制限酵素 Bam HI で処理した。一方、pEF1-BOSbcl-x を Bam HI で処理して 2 本の DNA 断片 (5650 bp と 650 bp) を調製し、長い DNA 断片 (5650 bp) に前記 PCR 産物を順方向に結合させ、Gln26Asn の変異を有するクローン pEF1-BOSbcl-xQ26N を得た。

【0023】

次に、この pEF1-BOSbcl-xQ26N をテンプレートとして、前記プライマー 1 およびプライマー 7 (配列番号 9) の組み合わせと、前記プライマー 4 およびプライマー 8 (配列番号 10) の組み合わせでふたつの PCR を別々に行った。反応溶液 ($100 \mu\text{l}$) の組成は前記と同様であり、反応条件は前記の条件 1 とした。なお、プライマー 7 は bcl-x c DNA のアンチセンス配列で、Tyr22 のコドンに Phe をコードするように塩基置換されている。また、プライマー 8 は bcl-x c DNA のセンス配列で、Tyr22 のコドンに Phe をコードするように塩基置換されており、5' 側半分の塩基配列はプライマー 7 の 5' 側半分の塩基配列と相補的である。

【0024】

この PCR で増幅された 2 つの PCR 産物をポリアクリルアミドゲル電気泳動で精製し、2 つの DNA 断片 (それぞれ 6ng) を混合し、AmpliTaqGOLD を使って相補鎖を合成した。合成条件は前記の反応条件 2 と同一とした。反応後、プライマー 1 とプライマー 4 (最終濃度各 $1 \mu\text{M}$) と AmpliTaqGOLD (2.5 U) を含む PCR 反応溶液 ($75 \mu\text{l}$)、前記の反応条件 1 により PCR を行った。

【0025】

この PCR により得られた 650 bp の PCR 産物をポリアクリルアミドゲル電気泳動で精製し、制限酵素 Bam HI で処理した。一方、pEF1-BOSbcl-x を Bam

HI (650 bp) と前記 PCR 産物を順方向に結合させ、Gln26Asn の変異を有するクローン pEF1-BOSbcl-xY22F/Q26N を得た。

【0026】

最後に、pEF1-BOSbcl-xR165KとpEF1-BOSbcl-xY22F/Q26Nをそれぞれ2種類の制限酵素(Bgl IIとKpn I)で切断し、pEF1-BOSbcl-xY22F/Q26N由来の約1000 bpのBgl II/Kpn I DNA断片(Tyr22PheとGln26Asnの変異を持つ)と、pEF1-BOSbcl-xR165K由来の約5300 bpのBgl II/Kpn I DNA断片(Arg165Lysの変異を持つ)を結合させて改変型タンパク質Bcl-xL FNKをコードする改変型cDNAの組換えベクターpEF1-BOSbcl-xY22F/Q26N/R165Kを得た。

実施例2：形質転換細胞の作成

マウス前骨髄芽球細胞FDC-P1を、RPMI1640培地に牛胎児血清(10%)とサイトカインIL-3(WEHI細胞培養液上清)を添加して培養した。ヒト白血病細胞Jurkat細胞は、RPMI1640培地に牛胎児血清(10%)を添加して培養した。培養はCO₂インキュベーター(5%CO₂/95%空気、37℃)で行った。

【0027】

実施例1で作成した組換えベクターpEF1-BOSbcl-xY22F/Q26N/R165Kは大腸菌DH5αMCR(GIBCO BRL社)内で増幅させ、Qiagen Plasmid midi Kit(Qiagen社)で調製した。制限酵素Sca I(切断部位は1つ)で切断し、開環して直鎖状になったDNAを1 mM EDTA溶液に溶かした。

【0028】

増殖期の細胞(FDC-P1,あるいはJurkat)を氷冷K-PBS溶液(30.8 mM NaCl, 120.7 mM KCl, 8.1 mM Na₂HPO₄, 1.46 mM KH₂PO₄)で3回洗浄し、5 mM MgCl₂を含むK-PBS(Mg-K-PBS)に10⁷細胞/mlになるように懸濁した。氷冷したキュベット(Electroporation Cuvettes Plus, 4 mm Gap, BTX, A Division of Genetronics)に細胞懸濁液0.4 mlとMg-K-PBS溶液0.4 mlを混合し、導入する直鎖状pEF1-BOSbcl-xY22F/Q26N/R165K(10 μg)と薬剤geneticin耐性遺伝子を持つ直鎖状DNA pST-neoB(0.5 μg)を加えた。DNA添加による体積の変化は1%以下とした。10分間氷冷した後、Gene Pulser(BioRad社)を用いて250 μF、330 Vの条件でエレクトロポレーションを行い、組換えベクターを導入した。10分間氷冷した後、100-mmディッシュの中で39 mlの培地に穏やかに懸濁し、CO₂イ

ンキュベーターで培養した。1日後、細胞を96穴プレートに分注した。FDC-P1細胞ではgeneticin(GIBCO BRL)を200 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 加え、またJurkat細胞ではgeneticinを1 mg/ml 加え、geneticin耐性細胞を選別した。

実施例3：改変型Bcl-xLFNK発現量の解析

実施例2で作成した形質転換細胞が発現している改変型Bcl-xLFNKの発現量をウェスタンブロットにより解析した。細胞をPBS (pH7.4; NaCl 137 mM, Na_2HPO_4 8.1 mM, KCl 2.68 mM, KH_2PO_4 1.47 mM)で1回洗浄後、2% SDS (sodium dodecyl sulfate)水溶液を加え超音波によって全タンパク質を可溶化した。BCA Protein Assay (PIERCE社)で蛋白質定量を行い、20 μg のタンパク質をSDS-ポリアクリルアミドゲル電気泳動(レムリの系)で分画した。泳動後、PVD Fメンブレン(Amersham Pharmacia Biotech社)にブロッティングした。メンブレンを牛胎児血清(10%)でブロッキングし、ラットBcl-xLのC末端の領域を認識するマウス由来モノクローナル抗体105-1 (0.5 $\mu\text{g}/\text{ml}$)を含むTBS溶液(Tris-HCl pH7.4 20 mM, NaCl 136 mM, Tween80 0.2%)に浸け、37°Cで1時間保温した。TBSで十分に洗浄したのち、HRP(西洋ワサビペルオキシダーゼ)あるいはAP(アルカリフォスファターゼ)が結合した2次抗体を含むTBS溶液に浸けて37°Cで1時間保温した。HRPが結合した2次抗体ではRENAISSANCEキット(NEN Life Science Product社)を用いてX線フィルムに、APが結合した2次抗体ではATTOPOSキット(ベーリンガー社)を用いてフルオロイメージアナライザーFLA-2000(Fujifilm社)でBcl-xLおよびBcl-xLFNKを可視化して定量した。

【0029】

結果は図2に示したとおりである。組換えベクターpEF1-BOSbcl-xLFNKを導入した細胞は、野生型bcl-xLのクローンpEF1-BOSbcl-xLを導入した細胞と同一分子量(約30kDa)のタンパク質を発現していることが確認された。

図2. Bcl-xLタンパク質の発現

実施例2で作成した形質転換細胞Jurkatbcl-xLFNKについて、各種のアポト

ーシス誘因に対する抵抗性（非感受性）を試験した。結果は図3～図13に示す。これらの図において、白抜き丸印（○）は改変型 Bcl-xL FNK を発現しているトランスフェクタント Jurkatbcl-xFNK、黒丸印（●）は同程度の蛋白量の正常 Bcl-xL を発現しているトランスフェクタント Jurkatbcl-x、白抜き四角印（□）はベクタープラスミッド DNA のみを導入した Jurkatvec、白抜き菱印（◇）は遺伝子導入に用いた親株 Jurkat を示す。

(a) 血清除去によって誘導されるアポトーシスに対する抵抗性

各細胞を PBS で3回洗浄した後、 1×10^5 個/ml になるように血清を含まない培地 RPMI 1640 に懸濁した。CO₂ インキュベーターで保温し、トリパンブルーで染色されない細胞（生細胞）の数を日をおって測定した。生細胞数が 5×10^5 /ml を超えないように注意し、超えそうな時は培地を2倍に希釈した。3日目ごとに血清を含まない培地の半分を新鮮なものと入れ替えた。

【0030】

結果は図3に示したとおりであり、コントロールの親株やベクター導入細胞に比較して、野生型 Bcl-xL を発現する形質転換細胞は血清除去に対して抵抗性を示し、長期間にわたって生存した。そして、改変型 Bcl-xL FNK を発現する形質転換細胞は、野生型 Bcl-xL 発現細胞よりもさらに長期間にわたって生存することから、その優れたアポトーシス抑制効果が確認された。また、この形質転換細胞は、無血清培地でも培養可能であることが確認された。

(b) 抗 Fas 抗体 (anti-Fas) に対する抵抗性

各細胞を 1×10^5 個/ml になるように培地 RPMI 1640 に懸濁し、抗 Fas 抗体（クローン CH-11：MBL 社）を 1、10、100、1000 ng/ml の濃度で加えた。1日培養したのち、トリパンブルーで染色されない細胞（生細胞）の数を測定した。

【0031】

結果は、抗 Fas 抗体未処理の生細胞数を100%として図4に示した。この図4から明らかなように、改変型 Bcl-xL FNK を発現する形質転換細胞は高濃度の抗 Fas 抗体に対して高い抵抗性を示した。

(c) 抗癌剤を含む各種の細胞毒性因子に対する抵抗性

各細胞を 1×10^5 個/ml になるように培地 RPMI 1640 に懸濁し、スタウロスポ

リン(staurosporine: 20 nM)、TN-16(10 μ M)、カンプトテシン(camptothecin: 10 μ M)、ヒドロキシウレア(hydroxyurea: 1 mM)、トリコスタチンA(trichostatin A: 0.25 μ g/ml)、過酸化水素(hydrogen peroxide: 0.05 mM)、パラコート(paraquat: 1 mM)を加え、培養した。トリパンブルーで染色されない細胞(生細胞)の数を日をおって測定した。

【0032】

結果は図5~11に示したとおりであり、改変型Bcl-xL FNKを発現する形質転換細胞は、試験した全ての細胞毒性因子に対して高い抵抗性を示した。

(d) 熱に対する抵抗性

各細胞を 1×10^5 個/ml になるように培地 RPMI 1640 に懸濁し、45℃ で10分間処理した。遠心して等量の新鮮な培地に細胞を懸濁し、37℃ で培養した。トリパンブルーで染色されない細胞(生細胞)の数を日をおって測定し、図12に示した。また、培養1日目でWST-1を基質にしたCell Counting Kit(同仁化学)で細胞(培養液100 μ l)が持つ脱水素酵素の活性を調べ(WST-1 Assay)、加熱未処理の細胞が持つ酵素活性を100%として図13に示した。

【0033】

これらの結果から明らかなように、改変型Bcl-xL FNKを発現する形質転換細胞は熱に対して高い抵抗性を示すとともに、熱処理によっても脱水素酵素活性を高いレベルで維持することが確認された。

実施例5: 形質転換細胞FDC-P1 bcl-xFNKのアポトーシスに対する

抵抗性の確認

実施例2で作成した形質転換細胞FDC-P1 bcl-xFNKについて、各種のアポトーシス誘因に対する抵抗性を試験した。結果は図14~図16に示す。これらの図において、白抜きの◇、□、△、▽、○は、クローン化された5種類のトランスフェクタントFDC-P1 bcl-xFNK-1、-2、-3、-4、-5を示す。また、●は、同程度の蛋白量の正常Bcl-xLを発現しているトランスフェクタントF

vecを示す。

(a) TN-16とスタウロスポリン(staurosporine)に対する抵抗性

各細胞を 2×10^5 個/ml になるように培地に懸濁し、TN-16 ($50 \mu\text{M}$) とスタウロsporin (10 nM) を加えて培養した。日をおって WST-1 を基質にした Cell Counting Kit (同仁化学) で細胞 (培養液 $100 \mu\text{l}$) が持つ脱水素酵素の活性を調べた (WST-1 Assay)。酵素活性は薬剤を加える直前の活性を 100% とした。

【0034】

結果は図14および15に示すとおりである。改変型 Bcl-xL FNK を発現する形質転換細胞のクローンはいずれも、TN-16 およびスタウロsporin 処理に対して、脱水素酵素活性を高いレベルで維持することが確認された。

(b) サイトカイン IL-3 除去により誘導されるアポトーシスに対する抵抗性

各細胞を3回 PBS で洗浄後、IL-3 を含まない培地 (血清は含む) に約 5×10^4 個/ml になるように懸濁し、トリパンブルーで生細胞数を測定した。日をおって同様に生細胞数を測定し、IL-3 を除去した直後の生細胞数を 100% とし、図16に示した。なお、FDC-P1 vec を除いた他の細胞について3日目に IL-3 を含まない新鮮な培地で5倍希釈した。

【0035】

図16から明らかなように、改変型 Bcl-xL FNK を発現する形質転換細胞のクローンはいずれも、IL-3 除去によって誘導されるアポトーシスに対して、野生型 Bcl-xL 発現細胞よりも高い抵抗性を示し、IL-3 非存在下でも細胞が増殖することが確認された。

実施例 6 : 形質転換 CHO 細胞の作成

チャイニーズハムスター卵巣細胞 CHO を、実施例 1 で作成した組換えベクター組換えベクター pEF1-BOS bcl-xY22F/Q26N/R165K によって形質転換した。

【0036】

CHO 細胞 1×10^5 個を 10% 牛胎児血清を含む培養液 DMEM/F-12 (GIBCO BRL 社) に懸濁し、60-mm ディッシュで一晩培養した。SuperFect Transfection Reagent キット (Qiagen 社) を用いて直鎖状 pEF1-BOS bcl-xY22F/Q26N/R165K ($10 \mu\text{g}$) と薬剤 Geneticin 耐性遺伝子を持つ直鎖状 pST-neoB ($0.5 \mu\text{g}$) を CHO 細胞にコトランスフェクションした。コントロールとして、直鎖状ベクタ

-pEF1-BOSおよび直鎖状pEF1-BOSbcl-xもそれぞれ直鎖状pST-neoBとともにCHO細胞に導入した。遺伝子導入処理後、10%牛胎児血清を含む培養液DMEM/F-12で一晩培養した。Geneticin ($700 \mu\text{g}/\text{ml}$) を加えて培養し、形質転換細胞を得た。それぞれの形質転換細胞について、実施例3と同様にして、改変型タンパク質Bcl-xL FNKと野生型Bcl-xLを多量かつ同程度に発現している細胞を選択し、CHO bcl-x、CHO bcl-x FNK、およびベクターのみが導入されたCHO vecを得た。

実施例7：形質転換CHO細胞の無血清培地での培養

実施例6で作成した3種類の形質転換細胞CHO bcl-x FNK、CHO bcl-xおよびCHO vecを10%牛胎児血清を含む培養液DMEM/F-12で培養した。増殖期の細胞 1×10^3 個を100-mmディッシュに植え継ぎ、3%牛胎児血清を含む培養液DMEM/F-12で培養した。1日ごとに培養液の2/3を牛胎児血清を含まない培養液DMEM/F-12で入れ替え、5日目からは完全に牛胎児血清を含まない培養液DMEM/F-12で培養し、さらに6日間培養した。

【0037】

結果は図17の写真に示したとおりである。改変型Bcl-xL FNKを発現するCHO bcl-x FNK (図17右下) は、ベクターのみを導入したCHO vec (図17右上) よりもはるかに良好に増殖した。また、Bcl-xL発現細胞 (図17左上) に比べて死細胞が少なく、かつ細胞間の接触が維持されているコロニーを形成した。

【0038】

以上の結果から、この発明の形質転換細胞は、無血清培地でも正常な形態で良好に増殖することが確認された。

【0039】

【発明の効果】

以上詳しく説明したとおり、この出願によって、アポトーシス抑制作用がさらに増強された改変型ラットBcl-xLタンパク質を細胞内で発現することのできる

ベクターによる形質転換細胞が提供される。この形質転換細胞は、無血清培地でも増殖可能であり、例えば、生理活性物質やモノクローナル抗体等の有用物質を

効率よく生産するための細胞培養系等として有用である。

【 0 0 4 0 】

【配列表】

SEQUENCE LISTING

<110> 科学技術振興事業団 (Japan Science and Technology Corporation)

<120> ラット bcl-xL 遺伝子の改変型 cDNA

<130> NP99241-YS

<160> 10

<170> PatentIn Ver. 2.0

<210> 1

<211> 1742

<212> DNA

<213> Rattus norvegicus

<220>

<221> CDS

<222> (72)..(773)

<300>

<302> An additional form of rat Bcl-x, Bcl-xbeta, generated by an unspliced RNA, promotes apoptosis in promyeloid cells.

<303> J. Biol. Chem.

<304> 271

<305> 22

<306> 13258-13265

<307> May 31, 1996

<400> 1

cacagagcag acccagtgag tgagcaggtg ttttggacaa tggactggtt gagcccatct 60
ctattataaa a atg tct cag agc aac cgg gag ctg gtg gtt gac ttt ctc 110

Met Ser Gln Ser Asn Arg Glu Leu Val Val Asp Phe Leu

	1	5	10	
tcc tac aag ctc tcc cag aaa gga tac agc tgg agt cag ttt agc gat				158
Ser Tyr Lys Leu Ser Gln Lys Gly Tyr Ser Trp Ser Gln Phe Ser Asp				
15	20	25		
gtc gaa gag aac agg act gaa gcc cca gaa gaa act gaa cca gaa agg				206
Val Glu Glu Asn Arg Thr Glu Ala Pro Glu Glu Thr Glu Pro Glu Arg				
30	35	40	45	
gag acc ccc agt gcc atc aat ggc aac cca tcc tgg cac ctg gcg gat				254
Glu Thr Pro Ser Ala Ile Asn Gly Asn Pro Ser Trp His Leu Ala Asp				
50	55	60		
agc ccc gcg gtg aat gga gcc act ggc cac agc agc agt ttg gat gcg				302
Ser Pro Ala Val Asn Gly Ala Thr Gly His Ser Ser Ser Leu Asp Ala				
65	70	75		
cgg gag gta atc ccc atg gca gca gtg aag caa gcg ctg aga gag gct				350
Arg Glu Val Ile Pro Met Ala Ala Val Lys Gln Ala Leu Arg Glu Ala				
80	85	90		
ggc gat gag ttt gaa ctg cgg tac cgg aga gca ttc agt gat cta aca				398
Gly Asp Glu Phe Glu Leu Arg Tyr Arg Arg Ala Phe Ser Asp Leu Thr				
95	100	105		
tcc cag ctt cat ata acc cca ggg aca gca tat cag agc ttt gaa cag				446
Ser Gln Leu His Ile Thr Pro Gly Thr Ala Tyr Gln Ser Phe Glu Gln				
110	115	120	125	
gta gtg aat gaa ctc ttt cgg gat ggg gta aac tgg ggt cgc att gtg				494
Val Val Asn Glu Leu Phe Arg Asp Gly Val Asn Trp Gly Arg Ile Val				
130	135	140		
gcc ttc ttc tcc ttt ggc ggg gca ctg tgc gtg gaa agc gta gac aag				542
gag atg cag gta ttg gtg agt cgg att gca agt tgg atg gcc acc tac				590

Glu Met Gln Val Leu Val Ser Arg Ile Ala Ser Trp Met Ala Thr Tyr

160

165

170

ctg aat gac cac cta gag cct tgg atc cag gag aac ggc ggc tgg gac 638

Leu Asn Asp His Leu Glu Pro Trp Ile Gln Glu Asn Gly Gly Trp Asp

175

180

185

act ttt gtg gat ctc tac ggg aac aat gca gca gcc gag agc cgg aaa 686

Thr Phe Val Asp Leu Tyr Gly Asn Asn Ala Ala Ala Glu Ser Arg Lys

190

195

200

205

ggc cag gag cgt ttc aac cgc tgg ttc ctg acg ggc atg act gtg gct 734

Gly Gln Glu Arg Phe Asn Arg Trp Phe Leu Thr Gly Met Thr Val Ala

210

215

220

ggt gta gtt ctg ctg ggc tca ctc ttc agt cgg aag tga ccagacactg 783

Gly Val Val Leu Leu Gly Ser Leu Phe Ser Arg Lys

225

230

accgtccact caccctctac ctcccacatt gccccacca caactctctc ttcagccacc 843

attgctacca ggagaaccac tacatgcaac tcacgccctt tcccctatta tagggttggg 903

cctagacgga gtccccigca gttagcttct tagaatctac cacgcttctg tgaaagccac 963

cttccccca catctcagtt ccttggcct caaaactcac aaggtttttc ctcagatcag 1023

ctccttggag gctggcagga gtgggaaggg gtgtgctaga gggagaagag cctgccttgt 1083

tggtgggacc ctgattaccc ctgagcctct cgggaatgct tttctggcag ggagctggag 1143

agctctctaa acctcttccc ccagagacta gattgccttg gttttgatgt gtgtggcctc 1203

agaattgac catttcccat tctgctgtgt ccttggggcg gctcctcctt cccatctcca 1263

ccccccccc ccagagcca ttgagtggag tgettttagc cttttgact aactaaaaat 1323

gcaggctgct tgggataacg aggcaaggac ctctcccca cctgtggcct ggccaagccc 1383

ccactcctgg tctgaatgtt ctctgaggc ctctggctag agtccagccc caccaggag 1443

gagggacgga gctgcggaaa gtccaccctg cgagagcctg agcggctctt gcggcttagc 1503

accacccag atccttctcc acccttcccc tggctccatg gtgacatga ctgagggacc 1563

aactgggccc acgctaggtg ccccagagct gttaatgact tcagctgcct cacttctgc 1623

aagatcagcc tgtggcatct ttgccttggg tgctggccac agggctccagg gactctggcc 1683

ttagcccaga agtgagagga agcttacagc gcagctatgg gagccctggg ggcttcct 1742

<210> 2

<211> 233

<212> PRT

<213> Modified protein

<400> 2

Met Ser Gln Ser Asn Arg Glu Leu Val Val Asp Phe Leu Ser Tyr Lys

1 5 10 15

Leu Ser Gln Lys Gly Phe Ser Trp Ser Asn Phe Ser Asp Val Glu Glu

20 25 30

Asn Arg Thr Glu Ala Pro Glu Glu Thr Glu Pro Glu Arg Glu Thr Pro

35 40 45

Ser Ala Ile Asn Gly Asn Pro Ser Trp His Leu Ala Asp Ser Pro Ala

50 55 60

Val Asn Gly Ala Thr Gly His Ser Ser Ser Leu Asp Ala Arg Glu Val

65 70 75 80

Ile Pro Met Ala Ala Val Lys Gln Ala Leu Arg Glu Ala Gly Asp Glu

85 90 95

Phe Glu Leu Arg Tyr Arg Arg Ala Phe Ser Asp Leu Thr Ser Gln Leu

100 105 110

His Ile Thr Pro Gly Thr Ala Tyr Gln Ser Phe Glu Gln Val Val Asn

115 120 125

Glu Leu Phe Arg Asp Gly Val Asn Trp Gly Arg Ile Val Ala Phe Phe

130 135 140

Ser Phe Gly Gly Ala Leu Cys Val Glu Ser Val Asp Lys Glu Met Gln

165 170 175

His Leu Glu Pro Trp Ile Gln Glu Asn Gly Gly Trp Asp Thr Phe Val

180 185 190
Asp Leu Tyr Gly Asn Asn Ala Ala Ala Glu Ser Arg Lys Gly Gln Glu

195 200 205
Arg Phe Asn Arg Trp Phe Leu Thr Gly Met Thr Val Ala Gly Val Val

210 215 220
Leu Leu Gly Ser Leu Phe Ser Arg Lys

225 230

<210> 3

<211> 26

<212> DNA

<213> Artificial sequence

<400> 3

nnnnnnacta gtggatcctg gaagag 26

<210> 4

<211> 28

<212> DNA

<213> Artificial sequence

<400> 4

gcaatcttac tcaccaatac ctgcatct 28

<210> 5

<211> 27

<212> DNA

<213> Artificial sequence

<400> 5

ggtgagtaag attgcaagtt ggatggc 27

<210> 6

<211> 19

<212> DNA

<400> 6

<213> Artificial sequence

tcctggatcc aaggctcta

19

<210> 7

<211> 28

<212> DNA

<213> Artificial sequence

<400> 7

gctaaagtta ctccagctgt atcctttc

28

<210> 8

<211> 31

<212> DNA

<213> Artificial sequence

<400> 8

ctggagtaac tttagcgatg tcgaagagaa c

31

<210> 9

<211> 26

<212> DNA

<213> Artificial sequence

<400> 9

ccagctgaat cctttctggg agagct

26

<210> 10

<211> 27

<212> DNA

<213> Artificial sequence

<400> 10

aaaggattca gctggagtaa ctttagc

27

野生型ラット Bcl-xL の構造模式図である。

【図 2】

形質転換細胞における改変型 Bcl-xL F N K 発現量のウエスタンブロット解析の結果である。

【図 3】

血清除去によって誘導されるアポトーシスに対する形質転換細胞の抵抗性試験の結果である。

【図 4】

抗 Fas 抗体 (anti-Fas) に対する形質転換細胞の抵抗性試験の結果である。

【図 5】

スタウロスポリンに対する形質転換細胞の抵抗性試験の結果である。

【図 6】

TN-16 に対する形質転換細胞の抵抗性試験の結果である。

【図 7】

カンプトテシンに対する形質転換細胞の抵抗性試験の結果である。

【図 8】

ハイドロキシウレアに対する形質転換細胞の抵抗性試験の結果である。

【図 9】

トリコスタチン A に対する形質転換細胞の抵抗性試験の結果である。

【図 1 0】

過酸化水素に対する形質転換細胞の抵抗性試験の結果である。

【図 1 1】

パラコートに対する形質転換細胞の抵抗性試験の結果である。

【図 1 2】

熱に対する形質転換細胞の抵抗性試験の結果である。

【図 1 3】

熱処理後の形質転換細胞の脱水素酵素活性を調べた W S T - 1 Assay の結果である。

【図 1 4】

TN-16 処理後の形質転換細胞の脱水素酵素活性を調べた W S T - 1 Assay の結

果である。

【図 15】

スタウロsporin 処理後の形質転換細胞の脱水素酵素活性を調べた WST-1 Assay の結果である。

【図 16】

サイトカイン IL-3 除去により誘導されるアポトーシスに対する形質転換細胞の抵抗性試験の結果である。

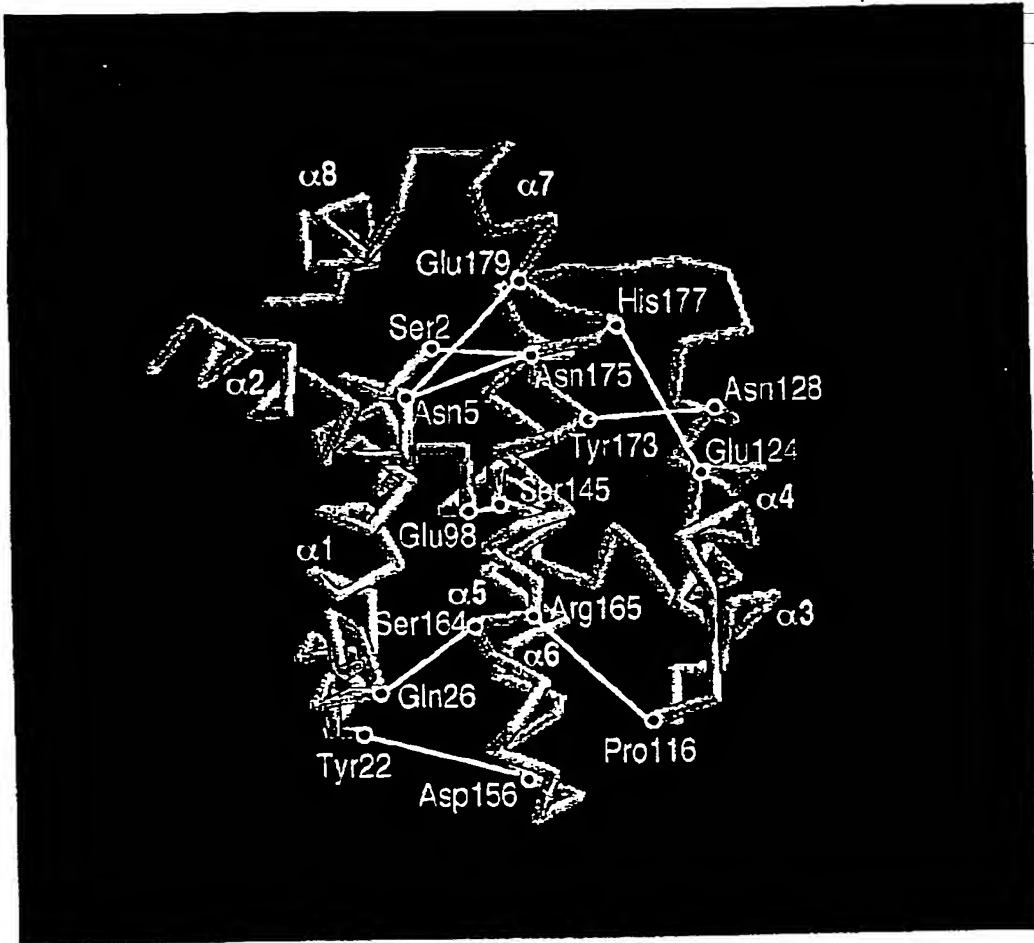
【図 17】

形質転換 CHO 細胞の無血清培地での増殖状態を示す顕微鏡写真である。

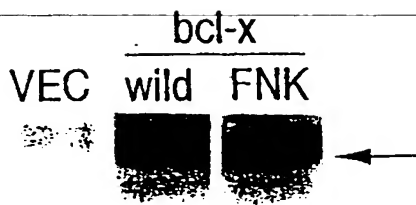
【書類名】

図面

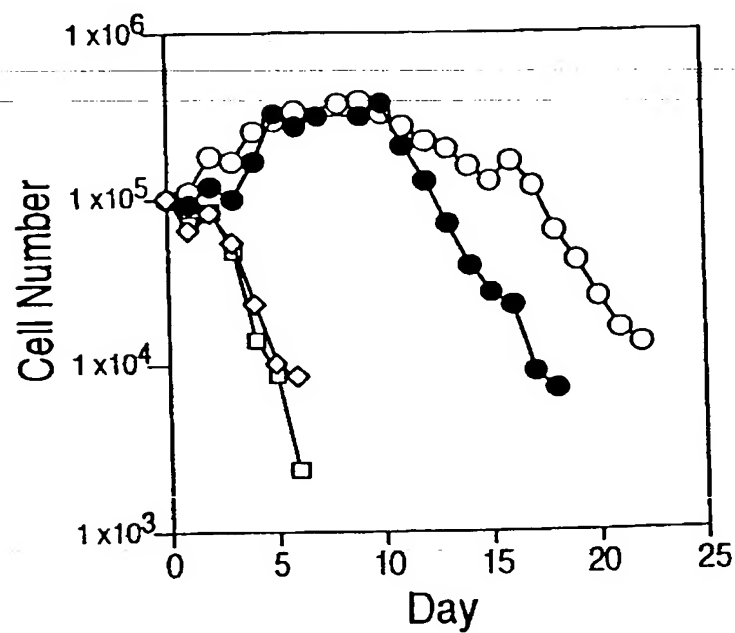
【図 1】



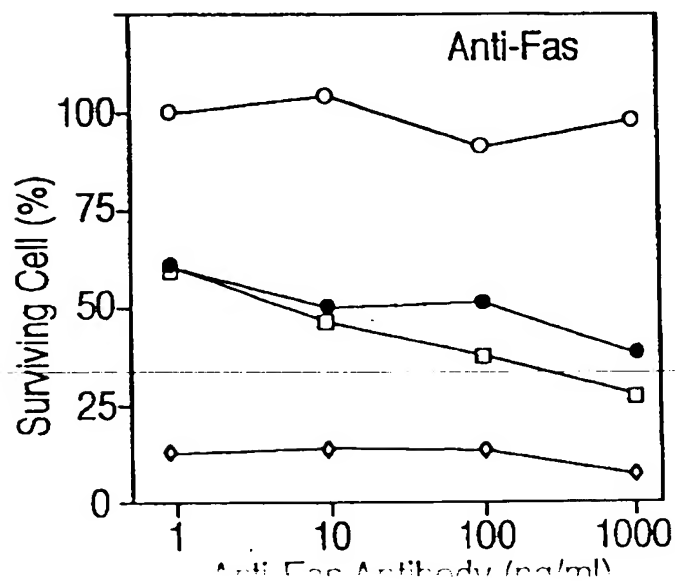
【図 2】



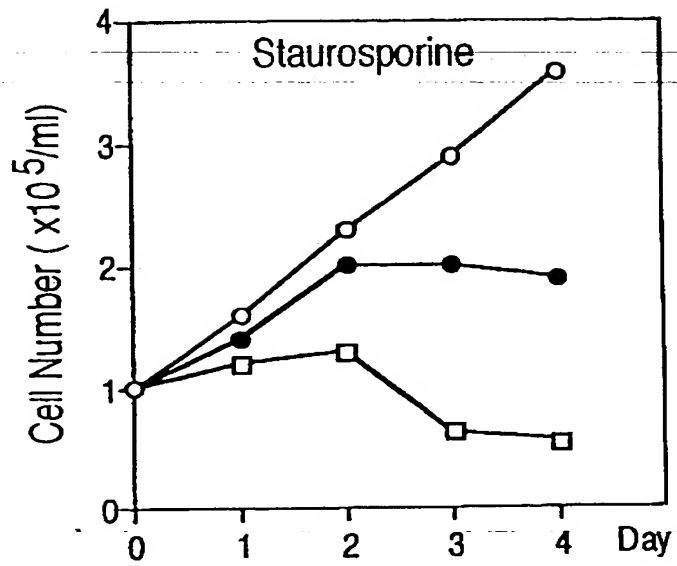
【图 3】



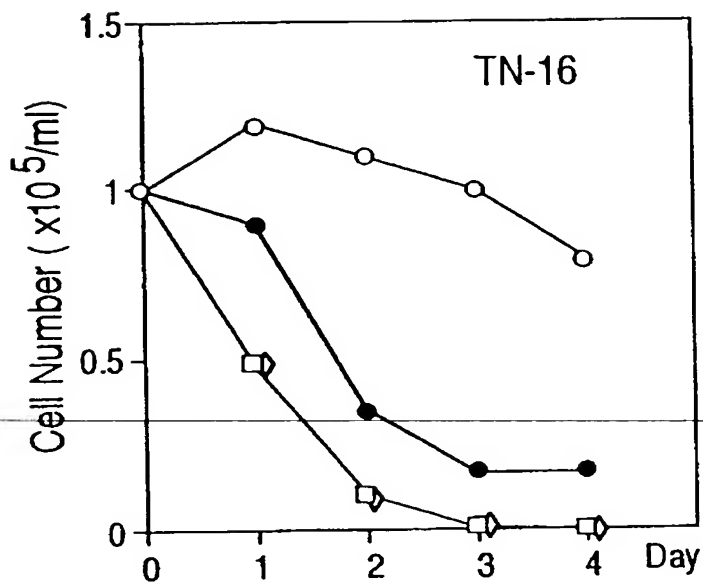
【图 4】



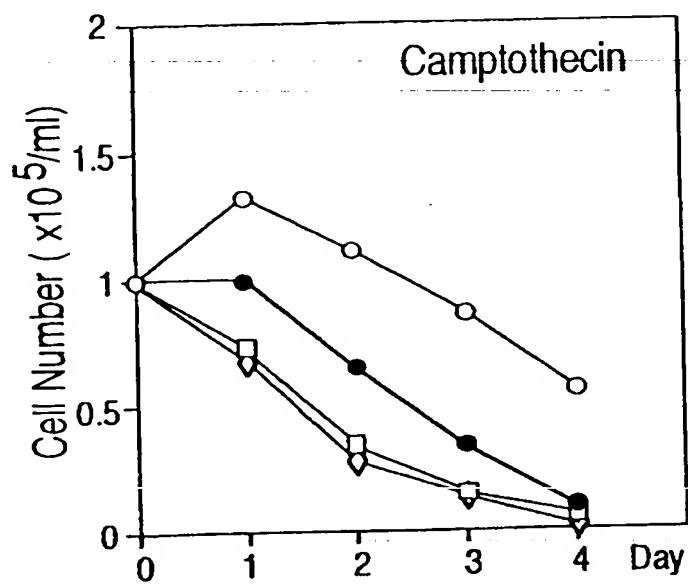
【図 5】



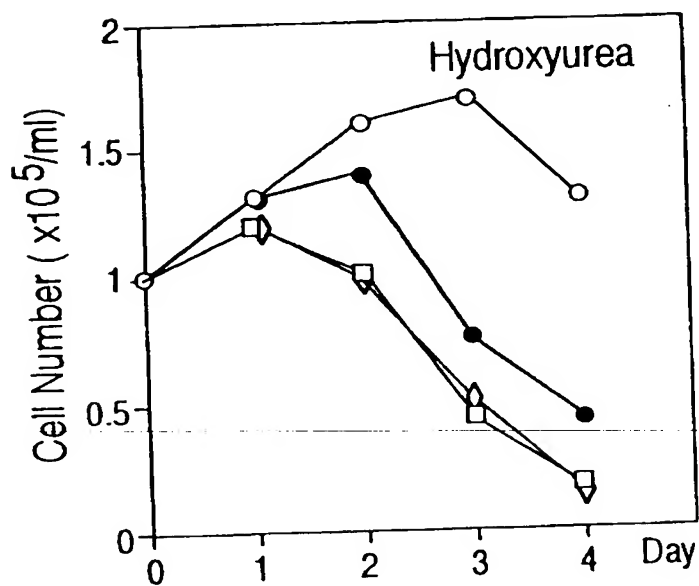
【図 6】



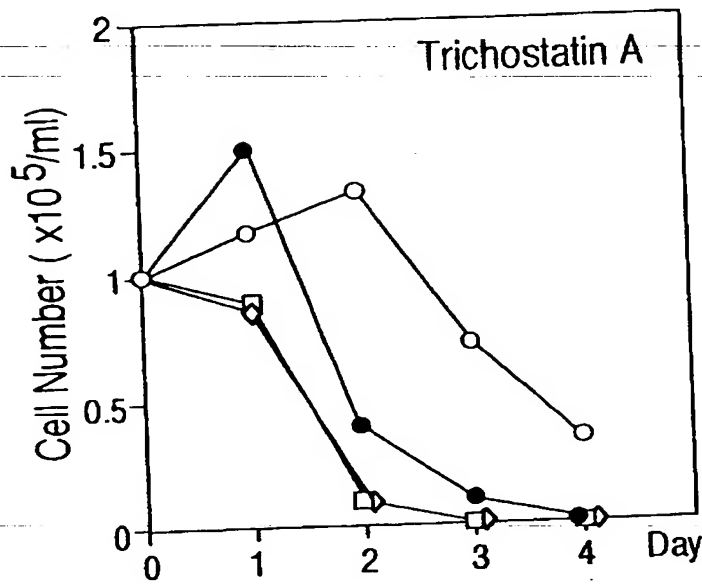
【図 7】



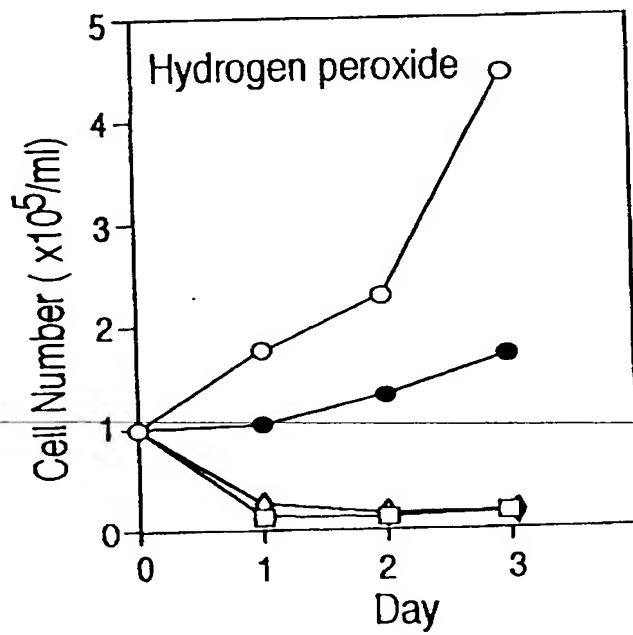
【図 8】



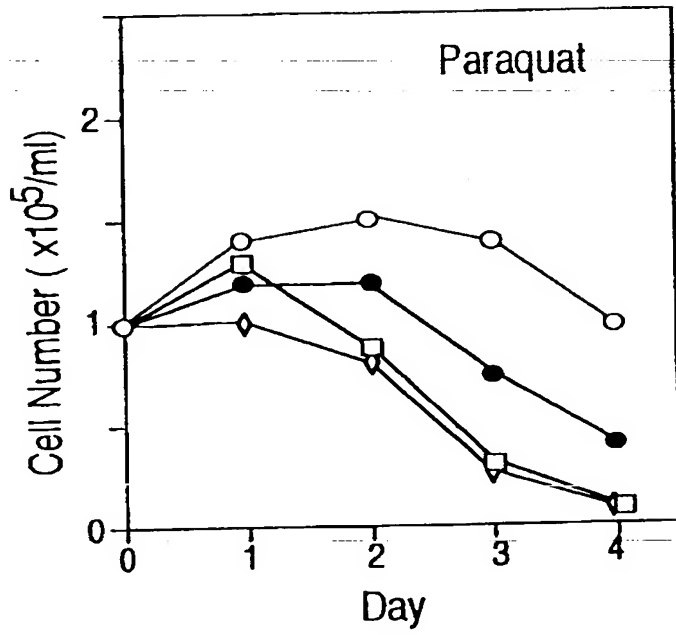
【図 9】



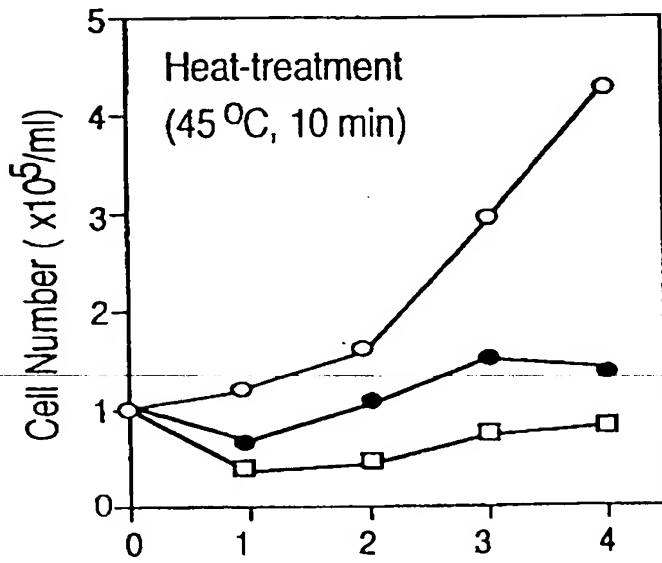
【図 10】



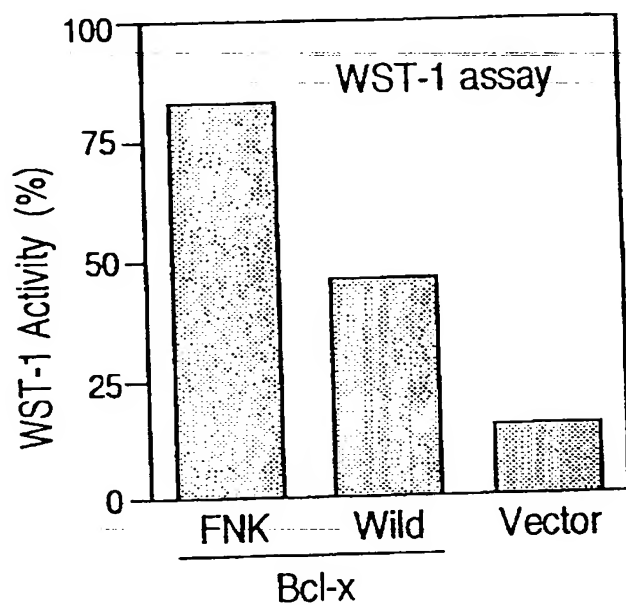
【图 1 1】



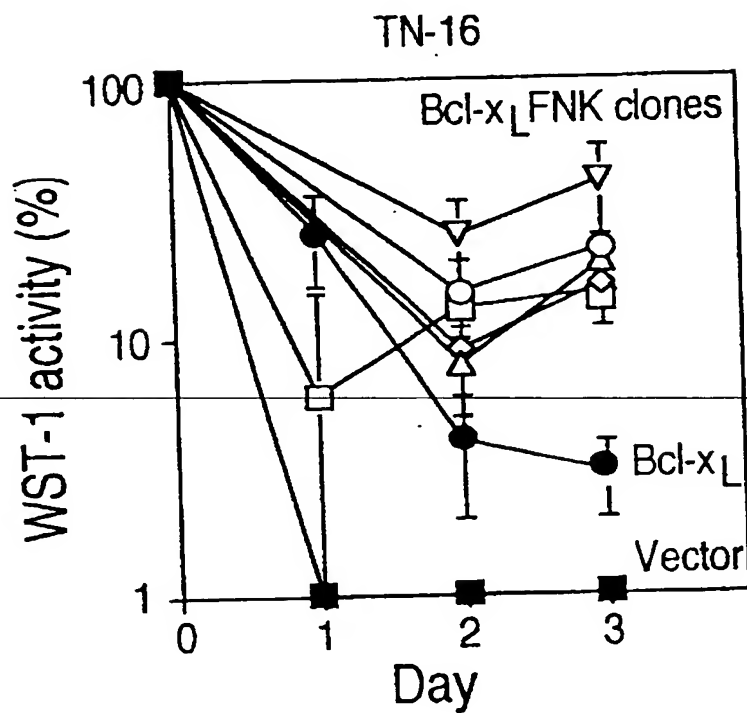
【图 1 2】



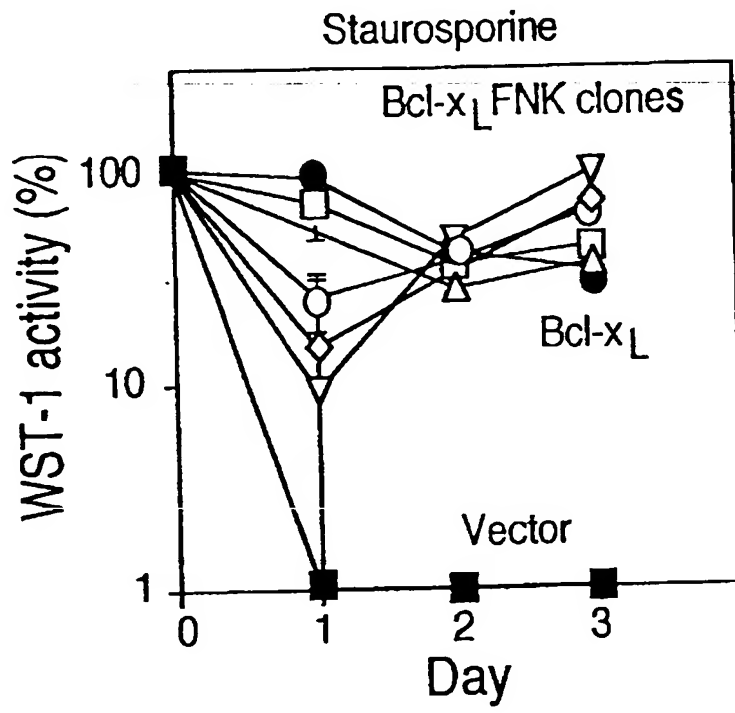
【図 13】



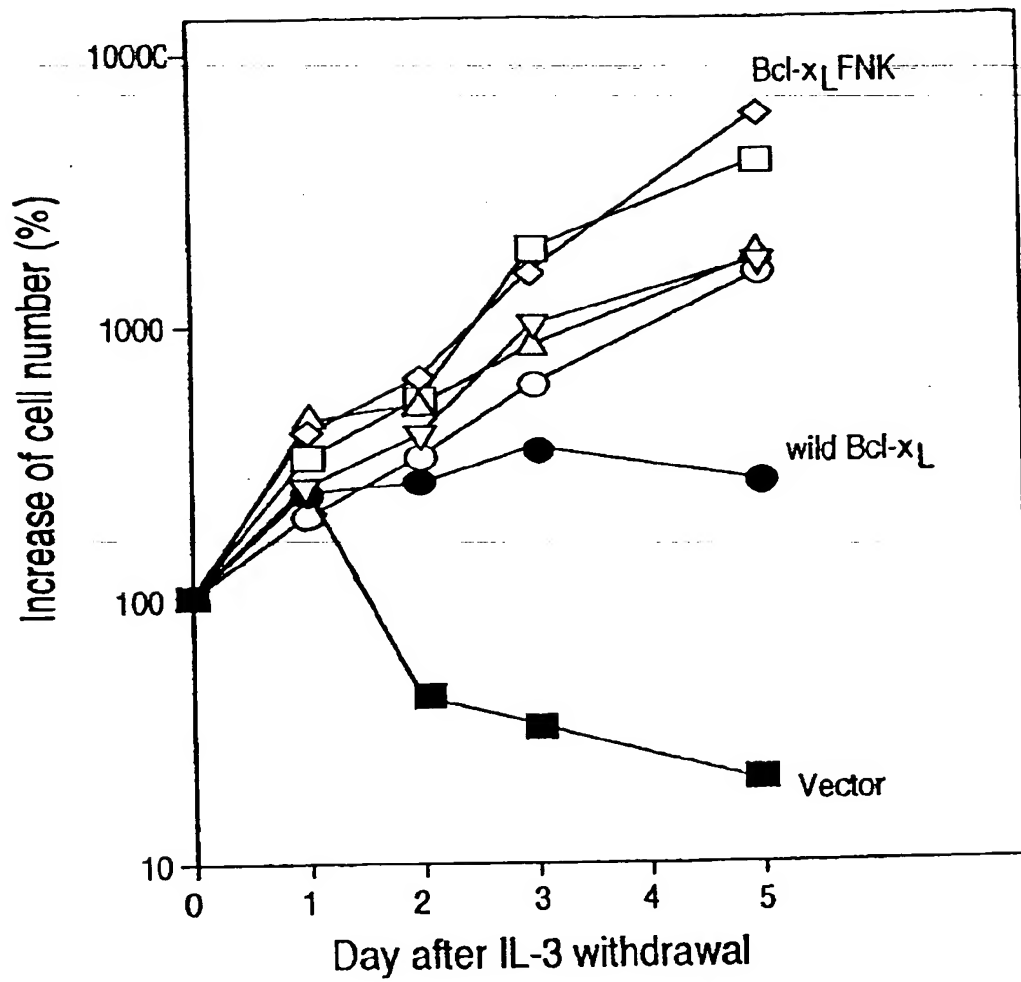
【図 14】



【図 1 5】



【図 16】



【書類名】 要約書

【要約】

【課題】 アポトーシス抑制作用がさらに増強された改変型ラット Bcl-xL タンパク質をコードする改変型 cDNA と、この改変型 cDNA を保有する組換えベクター、この組換えベクターによる形質転換細胞を提供する。

【解決手段】 配列番号 1 に塩基配列を示したラット bcl-xL 遺伝子 cDNA 配列において、第 22 番目 Tyr を Phe に変換する塩基置換、第 26 番目 Gln を Asn に変換する塩基置換および 165 番目 Arg を Lys に変換する塩基置換のうち、少なくとも一つの塩基置換を有することを特徴とするラット bcl-xL 遺伝子の改変型 cDNA、この改変型 cDNA を保有する組換えベクター、並びにこの組換えベクターが導入された形質転換細胞。

【選択図】 なし

出 願 人 履 歴 情 報

識別番号

[396020800]

1. 変更年月日

1998年 2月24日

[変更理由]

名称変更

住 所

埼玉県川口市本町4丁目1番8号

氏 名

科学技術振興事業団

